

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局

555246

(43) 国際公開日  
2004 年 11 月 25 日 (25.11.2004)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2004/100988 A1

(51) 国際特許分類: A61K 45/00, A61P 9/04, 9/06

(21) 国際出願番号: PCT/JP2004/006384

(22) 国際出願日: 2004 年 5 月 12 日 (12.05.2004)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願2003-134487 2003 年 5 月 13 日 (13.05.2003) JP

(71) 出願人 および

(72) 発明者: 宮崎 瑞夫 (MIYAZAKI, Mizuo) [JP/JP]; 〒6170843 京都府長岡京市友岡 4 丁目 1 番 5 号 Kyoto (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 高井 真司 (TAKAI,

Shinji) [JP/JP]; 〒5691123 大阪府高槻市芥川町 1 丁目 1 番 1 号 603 Osaka (JP).

(74) 代理人: 庄司 隆, 外 (SHOJI, Takashi et al.); 〒1010032 東京都千代田区岩本町 3 丁目 2 番 10 号 SN 岩本町ビル 6 階 Tokyo (JP).

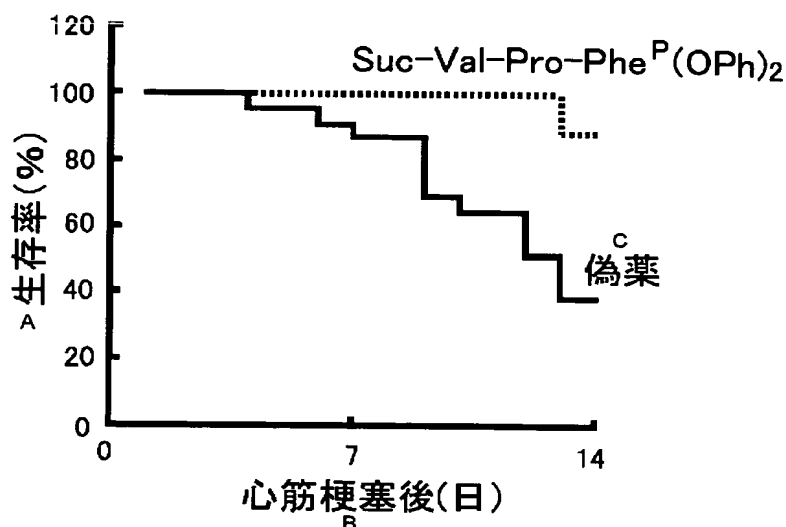
(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY,

[続葉有]

(54) Title: CARDIOPROTECTIVE AGENT

(54) 発明の名称: 心保護剤



A...SURVIVAL RATE (%)

B...DAYS AFTER MYOCARDIAL INFARCTION

C...PLACEBO

(57) Abstract: A medical agent capable of effective cardioprotection when the symptoms of hypertension, cardiomegaly, myocardial infarction, arteriosclerosis, diabetic or non-diabetic kidney diseases, arrhythmia accompanying re-stenosis, etc. after PTCA operation, cardiofibrosis and cardiac failure are concerned about. In particular, a medical agent comprising an effective amount of at least one protease inhibitor, intravenously or orally administered. The protease inhibitor is preferably a serine protease inhibitor which is specifically a chymotrypsin-like serine protease inhibitor. For example, use is made of a chymase inhibitor, viz. a peptide derivative of aryl diester of  $\alpha$ -aminoalkylphosphonic acid represented by Suc-Val-Pro-Phe<sup>P</sup>(OPh)<sub>2</sub>, preferably its enantiomer Suc-Val-Pro-L-Phe<sup>P</sup>(OPh)<sub>2</sub>.

[続葉有]

WO 2004/100988 A1



KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

添付公開書類:

— 国際調査報告書

(57) 要約: 本発明の課題は、高血圧、心肥大、心筋梗塞、動脈硬化、糖尿病性及び非糖尿病性腎疾患、PTCA施行後の再狭窄等に伴う不整脈、心臓繊維化、心不全の諸症状が危惧される場合に、効果的に心保護を可能とする薬剤を提供することである。静脈内投与又は経口投与することによる少なくとも1の効果的な量のプロテアーゼ阻害剤を含む薬剤による。該プロテアーゼ阻害剤は、好ましくはセリンプロテアーゼ阻害剤であり、該セリンプロテアーゼ阻害剤はキモトリプシン様セリンプロテアーゼ阻害剤である。具体的には、キマーゼ阻害剤であり、 $\text{Suc-Val-Pro-Phe}^p(\text{OPh})_2$ である $\alpha$ -アミノアルキルホスホン酸のアリールジエステルのペプチド誘導体であり、好ましくは鏡像異性体 $\text{Suc-Val-Pro-L-Phe}^p(\text{OPh})_2$ である。

## 明 細 書

### 心保護剤

### 技術分野

[0001] 本出願は、参照によりここに援用されるところの、日本特許出願番号特願2003-134487からの優先権を請求する。

本発明は、心保護作用を有するプロテアーゼ阻害剤に関する。さらに詳しくは心筋梗塞又は狭心症治療後の心保護作用を有する本発明はセリンプロテアーゼ阻害剤、特にキマーゼ阻害剤に関する。

### 背景技術

[0002] 従来より、心筋梗塞又は狭心症の治療方法は、内科的又は外科的治療方法に大別され、幾つかの治療法が実施されてきた。現在、臨床の場で用いられている内科的療法は、主に血栓溶解療法であり、心筋梗塞等の原因となる血栓を除去するために組織プラスミノゲン活性化因子(t-PA)、ウロキナーゼ(UK)等の線溶系薬剤が使用される。しかしながら、これら線溶系薬剤の大量投与により、患部以外の場所の生体にとって必要とされる血栓まで溶解されることになり、脳内出血等の重篤な副作用を併発することが問題である。また、これら線溶系薬剤はフィブリンを分解して血栓を溶解するものであるため、血栓の内容がフィブリンに由来するものでなければ、状況によっては十分な効果をあげられない場合がある。

[0003] 従って、現在では、このような内科的療法よりも、次の外科的療法がよく行われる状況にある。心筋梗塞や狭心症の原因となる血管の閉塞や狭窄を解消するための外科的療法として、今日では経皮的血管形成術(PCTA)、冠動脈バイパス手術(CAGB)等が行われている。しかし、これらはいずれも閉塞血管もしくは血管の狭窄部分を拡張もしくは迂回する方法であり、治療の実態から言えば、主要な冠動脈に対する療法であった。したがって、これらの治療方法が成功したとしても、心筋の虚血が全て消失するものではなく心筋の局所部位における虚血が依然として残り、心機能が十二分に回復しない場合があった。

[0004] 一方、血管新生作用を有する各種の因子を用いることにより、上記目的、即ち、心

筋の虚血部位に血管新生をもたらし、側副血行路の発達を促進することにより、虚血心筋へ新たな血液を供給することが試みられている。また、その他の外科的治療方法においても、新たな試みが行われ始めた。即ち、レーザーを用いた心筋内血管新生術(TMLR又はTMR:transmyocardial laser revascularization)による治療である(循環器Today,1, p.939-946, 1997)。このTMLR法は、レーザーにより心筋にチャネルを開けて心室腔内より直接に心筋を灌流することによる治療方法である。本法に関する結果として、冠動脈狭窄症に有効であったとの報告がなされている(Horvath KA et al, J. Thoracic and Cardiovasc Surg.,111, p.1041-1053, 1996、Cooley D A et al, J. Thoracic and Cardiovasc Surg.,111, p.791-799, 1996)。しかしながら、この方法には、開けたチャネルが詰まってしまう等の問題点があり、追試によるとあまり有効とは言えない結果も得られている(Burkhoff D,Ann Thrac Surg.,61, p.1532-1535, 1996)。

[0005] そこで、最近では、改良TMLR法(冠動脈周辺にレーザーで穴を開けて、血管新生を促進する方法)が開発されている。さらに、レーザーで開けたチャネルが詰まることを避けるために血管新生因子であるVEGFを用いて、この方法を改善することが試みられた。しかし、VEGFを用いて改良TMLR法との併用療法が行われたが、併用による効果は認められなかった(Annals of Thoracic Surgery,62, p.1051-1058, 1996)。以上のように近年では、心筋梗塞又は狭心症に対する内科的療法あるいは外科的療法が知られてはいるものの、いずれもこれらの方法の具体的な有効性は未だ明らかにされたものではなかった。

[0006] アンギオテンシンII(AngII)は、血圧上昇作用の他、細胞増殖促進作用を有することから、高血圧、心肥大、心筋梗塞、動脈硬化、糖尿病性及び非糖尿病性腎疾患、PTCA施行後の再狭窄等の疾患の原因物質又は危険因子と考えられている。また、AngIIはアンギオテンシン変換酵素(ACE)によりアンギオテンシンI(AngI)から生成されることが知られており、ACE阻害剤は上記疾病の予防・治療剤として多数開発されている。しかしながら、ACE阻害剤のPTCA後の再狭窄に対する予防効果を期待して施行されたMERCAPTOR試験(Circulation,86 ,1, p100, 1992)及びMARCAPTOR試験(J.Am.Coll.Cardiol., 27,1,p.1, 1996)の結果からは有効性は確認できなかった。上記臨床試験の成績は、ヒトにはACEの関与しないAngII産生経路が存在することを示唆

するものであった。一方、奥西らはセリンプロテアーゼの一種であるキマーゼと呼ばれる酵素がACEよりも高選択的にAngIをAngIIに変換することを明らかにした(Biochem.Biophys.Res.Comm.,149, p1186, 1987)。そこで、AngII産生の異常亢進に起因する心臓・循環器系疾患の予防・治療に結びつく臨床応用可能なキマーゼ阻害剤の開発が望まれている。上記課題を解決するために、キマーゼ阻害剤を心臓・循環器系疾患の予防治療剤として使用する発明も開示されている(特許文献1、2)。

[0007] しかしながら、上記キマーゼ阻害剤に関しては、投与方法、投与量等が明らかにされておらず、十分に効果を発揮しうるか否かは不明であった。

特許文献1:特開2000-95770号公開公報

特許文献2:特開平10-53579号公開公報

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0008] 本発明は、例えば高血圧、心肥大、心筋梗塞、動脈硬化、糖尿病性及び非糖尿病性腎疾患、PTCA施行後の再狭窄等に伴う不整脈、心臓繊維化、心不全の諸症状が危惧される場合に、各症状を軽減化し、効果的に心保護を可能とする薬剤を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0009] 本発明者らは、少なくとも1の効果的な量のプロテアーゼ阻害剤を、心不全の諸症状が危惧される場合の心保護に十分量一定期間投与することで、上記に伴うの諸症状が改善しうることに着目し、鋭意研究を重ねた結果、該プロテアーゼ阻害剤を含む薬剤を静脈内投与又は経口投与することで上記目的を解決しうることを見出し、本発明を完成した。

[0010] すなわち本発明は、以下よりなる。

1. 少なくとも1のプロテアーゼ阻害剤を有効量含む薬剤であって、静脈内投与又は経口投与されることを特徴とする心保護剤。
2. 該プロテアーゼ阻害剤が、セリンプロテアーゼの阻害剤である、前項1に記載の心保護剤。
3. 該セリンプロテアーゼの阻害剤が、キモトリプシン様セリンプロテアーゼの阻害剤

である前項2に記載の心保護剤。

4. 該キモトリプシン様セリンプロテアーゼの阻害剤が、キマーゼの阻害剤である前項3に記載の心保護剤。

5. 該キマーゼの阻害剤が、 $\alpha$ -アミノアルキルホスホン酸のアリールジエステルのペプチド誘導体である前項4に記載の心保護剤。

6. 該キマーゼの阻害剤が、 $\text{Suc-Val-Pro-Phe}^{\text{P}}(\text{OPh})_2$ である前項4の心保護剤。

7. 該キマーゼ阻害剤が、 $\text{Suc-Val-Pro-Phe}^{\text{P}}(\text{OPh})_2$ の鏡像異性体  
 $\text{Suc-Val-Pro-L-Phe}^{\text{P}}(\text{OPh})_2$ の濃縮製剤である前項4に記載の心保護剤。

8. 該鏡像異性体濃縮製剤において、 $\text{Suc-Val-Pro-L-Phe}^{\text{P}}(\text{OPh})_2$ が  
 $\text{Suc-Val-Pro-Phe}^{\text{P}}(\text{OPh})_2$ の総重量の95%以上を含有する前項7に記載の心保護剤。

9. 該プロテアーゼ阻害剤が、当該部位において当該プロテアーゼ阻害剤の効果的な局所濃度を維持する伝達体と結合して投与され、そして、当該伝達体は、ヒアルロン酸、ヒドロゲル、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、シクロデキストラン、そしてその化合物からなる集合体より選択された高分子量担体をなす、前項1〜8のいずれか1に記載の心保護剤。

10. 前項1〜9のいずれか1に記載のプロテアーゼ阻害剤と、薬学的に許容できる希釈液又は賦形剤からなる心保護剤混合物。

11. 脊椎動物被検体に対し、高血圧、心肥大、心筋梗塞、動脈硬化、糖尿病性及び非糖尿病性腎疾患、PTCA施行後の再狭窄等に伴う不整脈、心臓繊維化、心不全が危惧される場合における前項10に記載の心保護剤混合物を投与する不整脈、心臓繊維化及び／又は心不全の改善方法。

12. 前項10に記載の心保護剤混合物の使用に関し、高血圧、心肥大、心筋梗塞、動脈硬化、糖尿病性及び非糖尿病性腎疾患、PTCA施行後の再狭窄等に伴う不整脈、心臓繊維化、心不全が危惧される場合の不整脈、心臓繊維化及び／又は心不全に応用するための薬品を作るための使用。

13. 高血圧、心肥大、心筋梗塞、動脈硬化、糖尿病性及び非糖尿病性腎疾患、PTCA施行後の再狭窄等に伴う不整脈、心臓繊維化、心不全が危惧される場合の前

項10に記載の心保護剤混合物の不整脈、心臓繊維化及び／又は心不全改善剤としての使用。

### 発明の効果

- [0011] 本発明は、プロテアーゼ阻害剤を有効量含む薬剤を、静脈内投与又は経口投与することを特徴とする脊椎動物被検体の高血圧、心肥大、心筋梗塞、動脈硬化、糖尿病性及び非糖尿病性腎疾患、PTCA施行後の再狭窄等に伴う不整脈、心臓繊維化、心不全による諸症状の改善に関するものである。当該プロテアーゼ阻害剤は、例えばこれらの疾患の治療中又は後に投与することができる。

### 発明を実施するための最良の形態

- [0012] 本発明の薬剤は、温血の哺乳類の高血圧、心肥大、心筋梗塞、動脈硬化、糖尿病性及び非糖尿病性腎疾患、PTCA施行後の再狭窄等に伴う不整脈、心臓繊維化、心不全による諸症状を改善する為の薬剤であり、当該哺乳類に少なくとも1の効果的な量のセリンプロテアーゼ阻害剤を、静脈内投与又は経口投与により心保護作用に十分量一定期間投与することからなる。好ましい実施例は、少なくとも1のキモトリプシン様セリンプロテアーゼであるセリンプロテアーゼ阻害剤を使用する、心保護方法に関する。本発明の薬剤は当該温血哺乳類としてヒトに適用することができる。

本発明において、高血圧、心肥大、心筋梗塞、動脈硬化、糖尿病性及び非糖尿病性腎疾患、PTCA施行後の再狭窄等に伴う、不整脈、心臓繊維化、心不全に対する心保護作用が期待できる。

- [0013] (プロテアーゼ阻害剤)

本発明の薬剤に含有されるプロテアーゼ阻害剤は公知物質であり、医薬として使用できる程度に精製されたものであれば、種々の方法で調製されたものを使用することができる。

- [0014] 本発明の心保護剤の対象となるプロテアーゼ群は、好ましくはセリンプロテアーゼである。該セリンプロテアーゼは、ペプチド中のセリンを開裂結合させるエンドペプチダーゼのサブクラスである(Barrett, A.J., In: Protease Inhibitors, Ed. Barrett, A. J. et.al, Elsevir, Amsterdam, p.3-22, 1986)。セリンプロテアーゼ自体は公知である。例えばキモトリプシン・スーパーファミリー及び放線菌属(*Streptomyces*)ズブチリシン・ス

ースーパーファミリー等の2種のセリンプロテアーゼのスーパーファミリーが報告されている。

- [0015] セリンプロテアーゼ阻害剤は公知であり、以下の系統群に分類することができる。(1)ウシのすい臓来トリプシン阻害剤(クニッツ)ファミリーであり、塩基性プロテアーゼ阻害剤(Ketcham, L.K. et al, In:Atlas of Protein Sequence and Structure, Ed. Dayhoff, M. O., p.131-143, 1978)(以下「BPTI」という)としても知られている、(2) Kazal群、(3) 放線菌属(*Streptomyces*)ズブリシン阻害剤群(以下「SSI」という)、(4) 大豆トリプシン阻害剤(クニッツ)ファミリー、(6) ポテト阻害剤ファミリー、(7) ボウマンバークファミリー(Laskowski, M. et al. Ann. Rev. Biochem., 49:p.593-626, 1980)を含む。BPTI群、Kazal群、SSI群、大豆トリプシン群、ポテトトリプシン群のメンバを含む多くの完全な阻害剤と、Seprin- $\alpha$ -1-抗トリプシンの開裂型のための結晶学的データが利用できる(Read, R.J. et al, In:Protease Inhibitors, Ed. Barrett, A.J. et al, Elsevier, Amsterdam, p.301-336, 1986)などがあげられる。多くのセリンプロテアーゼ阻害剤は広い特異性をもち、血液凝固セリンプロテアーゼを含むプロテアーゼのキモトリプシン・スーパーファミリーとセリンプロテアーゼの放線菌属スーパーファミリー両者を抑制することができる(Laskowski et al, Ann. Rev. Biochem., 49:p.593-626, 1980)。各阻害剤の特異性は、セリンプロテアーゼの直接の開裂部位に対するアミノ末端のアミノ酸の同一性によって決定すると考えられている。P 部位残基として知られるこのアミノ酸は、セリンプロテアーゼの活性部位において、セリンとアシル結合を形成すると考えられている(Laskowski et al, Ann. Rev. Biochem., 49:p. 593 -626, 1980)。

- [0016] 本発明の薬剤に含有される好ましいセリンプロテアーゼ阻害剤は、セルピン(serpin)ファミリーとボウマンバーク(Bowman-Birk)ファミリーに属する。セルピンファミリーに対するセリンプロテアーゼ阻害剤として、プラスミノゲン活性化因子阻害剤である PAI-1、PAI-2、PAI-3があり、CIエステラーゼ阻害剤、 $\alpha$ -2-抗プラスミン、コントラプシン(contrapsin)、 $\alpha$ -1-抗トリプシン、抗トロンビンIII、プロテアーゼネクシンI、 $\alpha$ -1-抗キモトリプシン、プロテインC阻害剤、ヘパリンコファクターII及び成長ホルモン調節タンパク質が挙げられる(Carrell et al, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 52:



527-535, 1987)。

- [0017] キモトリプシン・スーパーファミリーのセリンプロテアーゼの例としては、組織型プラスミノゲン活性化因子(tissue-type plasminogen activator:t-PA)、トリプシン、トリプシン様プロテアーゼ、キモトリプシン、プラスミン、エラスターゼ、ウロキナーゼ(又は非尿型プラスミノゲン活性化因子(u-PA)、アクロシニン、活性化プロテインC、CIエステラーゼ、カプテシンG、キマーゼ、そしてカリクレイン、トロンビン、VIIa因子、IXa因子、Xa因子、XIa因子、XIIa因子を含む血液凝固カスケードのプロテアーゼなどが含まれる(Barrett, A.J., In: Protease Inhibitors, Ed. Barrett, A. J. et.al., Elsevir, Amsterdam, p.3-22, 1986, Strassburger, W.et.al, FEBS Lett., 157:p.219-223,1983)。
- [0018] キモトリプシン・スーパーファミリーのすべてのセリンプロテアーゼの触媒ドメインは、配列相同性と構造相同性をもつ。配列相同性は、(1)特異活性部位残基、例えば、トリプシンの場合に、195位のセリン、57位のヒスチジン及び102位のアスパラギン酸が共通する;(2)オキシアニオン孔(oxyanion hole)(例えば、トリプシンの場合に、193位のグリシン及び194位のアスパラギン酸)、(3)構造においてジスルフィド架橋を形成するシステイン残基、の全保存を含む(Hartley, B.S., Symp. Soc. Gen. Microbiol., 24:152-182(1974))。
- [0019] 構造相同性は(1)2つのグリーク・キー構造からなる一般ホールド(common fold)(Richrdsosn)、(2)触媒残基の一般要因、(3)分子核内での構造の精密な保存(Stroud,R.M., Sci. AM.,231:24-88)を含む。
- [0020] 本発明の薬剤は、 $\alpha$ -アミノアルキルホスホン酸のアリールジエステルのペプチド誘導体を含むことができる。ウシトロンビン、ヒト因子XIIa、ヒト因子Xa、ヒト結晶カリクレイン、ウシトリプシン、ラット皮膚トリプターゼ、ヒト白血球エラスターゼ、ブタすい臓エラスターゼ、ウシキモトリプシン、ヒト白血球カプテシンG、ラットマスト細胞プロテアーゼIIを含む幾多のセリンプロテアーゼの阻害剤に関し、これら $\alpha$ -アミノアルキルホスホン酸塩誘導体が発見されている(米国特許 5543396, 5686419, 5952307、他)。これらの誘導体は、ヒト血漿に含まれ、種々の環境下で非常に安定している。例えば、本発明の薬剤に含有される好適な阻害剤Suc-Val-Pro-Phe<sup>P</sup>(OPh)<sub>2</sub>、特に好ましくは

Suc-Val-Pro-L-Phe<sup>P</sup>(OPh)<sub>2</sub>は、ヒト血漿内で約20時間の半減期をもつ。この安定性は重要である。なぜなら、腹膜の浸出物は、大部分のプロテアーゼ阻害剤を中和し、活性を失わせると予測されるからである。アミノアルキルホスホン酸は $\alpha$ -アミノ酸に相似しており、そして、一般的に受容したアミノ酸のための上付き文字のPへと続く3文字の略称が命名された。例えば、アラニンに関するジフェニル $\alpha$ -(N-ベンジルオキシカルボニルアミノ(N-benzyloxycarbonylamino)エチルホスホネイト(ethylphosphonate)はCbz-Ala<sup>P</sup>(OPh)<sub>2</sub>と略称される。

[0021] C-末端のリン酸塩残基を有するペプチドVal<sup>P</sup>(OPh)<sub>2</sub>、それはバリンの類似体であるが、これは比較的有効で比較的特異的なエラスターゼ及びエラスターゼ様酵素に特異的な不可逆性阻害剤である。フェニルアラニン、他の芳香族アミノ酸又は長脂肪酸族側鎖と関連性があるC-末端リン酸塩残基は比較的有効であり、比較的特効のあるキモトリプシンとキモトリプシン様酵素の阻害剤である。オルニチン、溶解素、アルギニン又は、 $\alpha$ -アミノ- $\alpha$ -(4-アミジノフェニル)メタンホスホン酸塩 [(4-AmPhGly)<sup>P</sup>(OPh)<sub>2</sub>]又は $\alpha$ -アミノ- $\alpha$ -(4-アミジノフェニルメチル)メタンホスホン酸塩 [(4-AmPhe)<sup>P</sup>(OPh)<sub>2</sub>]のC-末端ジフェニルエステルに関連性があるペプチドは、比較的有効で比較的安全性のあるトリプシンとトリプシン様酵素の阻害剤である。

[0022] 酵素との反応に対する付加的な特異性及び／又は増加した活性は、ペプチド構造の部位におけるアミノ酸配列の変異により、阻害分子へ導くことができる。ペプチドのP-ニトロアニリドといった酵素基質の配列と効果的なペプチドのリン酸塩阻害剤の配列間には一般的に一致した配列がある。比較的高活性の阻害剤は、一般的に、特定の酵素のための好都合なペプチドのP-ニトロアニリド基質の配列をもつ。例えば、キモトリプシンそしてキモトリプシン様酵素に対して比較的有効な阻害剤である Suc-Val-Pro-Phe<sup>P</sup>(OPh)<sub>2</sub>は、これらの酵素に適当な基質である Suc-Val-Pro-Phe-NAと類似のアミノ酸配列を有する。ヒト白血球エラスターゼに比較的有効な阻害剤[Meo-Suc-Ala-Ala-Pro-Val<sup>P</sup>(OPh)<sub>2</sub>及びBoc-Val-Pro-Val<sup>P</sup>(OPh)<sub>2</sub>]は、この酵素に対する2つの適当な基質MeO-Suc-Ala-Ala-Pro-Val-NA及び Boc-Val-Pro-Val-NAと類似のアミノ酸配列をもつ。論文中に報告された、それらの同じセリンプロテアーゼのための比較的有効な可逆的・不可逆的な阻害剤中に発見

されたペプチド配列に基づくセリンプロテアーゼのためのホスホン酸塩阻害剤の設計も可能である(Powers and Harper, in *Protease Inhibitors*, Barrett and Salvesen, eds., Elsevier, p55-152, 1986; Trainore, D.A., *Trends in Pharm. Sci.* 8:303-307, 1987)。

[0023]  $\alpha$ -アミノアルキルホスホン酸のジフェニルエステルは前記方法により合成することができる(米国特許5543396)。 $\alpha$ -アミノアルキルホスホン酸の2(置換フェニル)エステルは、トリフェニル亜リン酸の代わりに3(置換フェニル)リン酸を使用する方法にて調製することができる。パーフルオロアルキルジエステルは、エステル転移反応に含まれる方法によって合成することができる(Szewczyk et al., *Synthesis*, p.409-414, 1982)。代わりに、前記のようにアミノアルキルホスホン酸のジエステルの合成とそれらのペプチドは、ホスホン酸部分のエステル化により行うことができる(Bartlett et al., *Bioorg. Chem.*, 14:356-377, 1986)。本発明の薬剤に含有される多くの付加的セリンプロテアーゼ阻害剤は、米国特許により開示される(米国特許 6262069, 5916888, 5900400, 5157019, 4829052, 5723316, 5807829)。

[0024] 多くの有機化合物は光学活性型が存在する。光学活性化合物を示す場合、識別コードDそしてL又はRそしてSが、キラル中心の分子の絶対配置を示すために使用される。識別コード(+)と(-)又はdとlは、水平偏光の回転のサインを示すため、化合物により使用される。(-)又はlは化合物が左旋回していることを意味し、化合物識別コード(+)又はdは化合物が右旋回していることを示す。立体異性体とよばれるこれらの化合物は、互いに鏡像であることを除けば同一である。特定の立体異性体は鏡像異性体として表すことができ、そのような異性体の混合物は鏡像異性混合物又は鏡像異性ラセミックと呼ばれることもある。本発明の薬剤の製法として、立体異性純度又は光学純度をより有効性を増加及び／又は有害作用を減少させる手段を利用することができる。

本明細書において使用される用語「キラル」は、鏡像相手の重合不可の性質の分子をしめすものである。しかしながら、用語「アキラル」は鏡像相手に重合可能な分子を示す。用語「立体異性体」は同一化学構造をもつ化合物を意味する。しかし、空間の原子又は群の配置に関しては相違する。特に「鏡像異性体」は、重合不可能な鏡像ともう一つの2種の化合物の立体異性体を意味する。

- [0025] 一方、「ジアステレオマ」は非対称の2以上の中心を持つ立体異性体を示し、その分子は相互に鏡像ではない。キラル中心の命名法に関しては、用語SとR配置がIUPAC1974(Recommendations for Section E., Fundamental Stereochemistry, Pure Appl. Chem., 45:13-30, 1976)により定義される。
- [0026] 本発明の薬剤に含有される化合物に関し、互換的に使われている用語「鏡像異性的に濃縮された」と「非ラセミ体」は、光学的に濃縮された構成物を示し、その構成物内では鏡像異性体のラセミ混合物と比較して、一方の鏡像異性体が濃縮されている。別に明記されていない場合は、それらは、望ましい鏡像異性体の望ましくない鏡像異性体に対する相対的な割合が1対1以上である構成物を示す。例えば、鏡像異性的に濃縮された製剤は、望ましい鏡像異性体の望ましくない鏡像異性体に対する相対的な割合が、重さにして50%以上であり、望ましくは少なくとも75%、さらに望ましくは80%である。もちろん濃縮物は、「十分に鏡像異性的に濃縮」された製剤、「十分に非ラセミ体の」製剤又は「十分に光学的に純粋」な製剤にすることにより80%以上とすることが可能であり、それは少なくとも望ましい鏡像異性体が85%以上、望ましくは90%以上、さらに望ましくは95%以上である薬剤を意味する。
- [0027] 鏡像体の分離は、既に公知の幾つかの方法によって達成することができる。例えば、2の鏡像異性体のラセミ混合物はクロマトグラフィーによって分離することができる(“Chiral Liquid Chromatography”, W.J. Lough, Ed. Chapman and Hall, New York, 1989)。鏡像異性体は、伝統的な分離技術によっても分離することができる。例えば、ジアステレオマ塩の構成物と分画結晶化によって鏡像異性体を分離することができる。カルボン酸の鏡像異性体の分離については、ジアステレオマ塩が、ブルシン、キニーネ、エフェドリン、ストリキニーネ、その他のような鏡像異性的に純粋なキラル塩基を添加することにより形成される。代わりに、ジアステレオマエステルは、遊離物質を産出するためのジアステレオマエステルの分離、加水分離に続いて、鏡像異性的に濃縮されたカルボン酸であるメントールのような鏡像異性的に純粋なキラルアルコールを加えることにより形成される。アミノ化合物の光学異性体の分離に関しては、キラルカルボン又はカンファースルホン酸、酒石酸、マンデル酸又は乳酸といったスルホン酸の添加によりジアステレオマ塩の形成といった結果になる。上記のような分離技術

のほかに、活性鏡像異性体は、既に公知の方法を使用し、望ましい光学異性体のみを産する立体特異的合成によっても合成することができる。キラル合成は高鏡像異性的純度の生成物を産出することができる。しかしながら、幾つかの事例では、生成物の鏡像異性的純度は特段高くない。熟練者たちは、キラル合成によって得られた鏡像異性的濃度をより高めるものとして、上記分離方法を高く評価している。鏡像異性体の光学的濃度は先行技術によって既知の方法によって決定される。例えば、鏡像異性体試料は、キラルクロマトグラフィーカラム上の高速液状クロマトグラフィーによって分析することができる。

[0028] 本発明の薬剤に含有されるセリンプロテアーゼ阻害剤としてのキマーゼ阻害剤は、温血の哺乳類の腹膜内の癒着形成を防止、抑制又は治療方法に使用され、当該哺乳類に少なくとも1の効果的な量のキマーゼ阻害剤を組織修復に十分量一定期間存在するように、静脈内投与又は経口投与することができる。

[0029] 好適には、例えば $\text{Suc-Val-Pro-Phe}^{\text{P}}(\text{Oph})_2$ といった $\alpha$ -アミノアルキルホスホン酸のアリールジエステルのペプチド誘導体であるキマーゼ阻害剤を使用することができる。より好適には、鏡像異性的に濃縮した $\alpha$ -アミノアルキルホスホン酸のアリールジエステルのペプチド誘導体、例えば $\text{Suc-Val-Pro-L-Phe}^{\text{P}}(\text{Oph})_2$ の製剤を使用することができる。この $\text{Suc-Val-Pro-L-Phe}^{\text{P}}(\text{Oph})_2$ は、全 $\text{Suc-Val-Pro-Phe}^{\text{P}}(\text{Oph})_2$ 重量の50%、80%好ましくは95%以上に濃縮したものが好適である。当該温血哺乳類はヒトであることが望ましい。濃縮する方法は、例えばアセトン-エーテルを用いて結晶化させ、再度同様に結晶化させることにより得ることができる。

[0030] (製剤)

本発明の薬剤は、前記プロテアーゼ阻害剤を単独で、あるいは適当な製剤用添加物と共に製剤形態の医薬組成物として調製し、投与することができる。このような医薬組成物の投与形態としては、経口的投与に使用されるもの、又は非経口的に投与されるものであれば特に限定されないが、例えば、錠剤、シロップ、注射用アンプル剤や注射用凍結乾燥粉末剤等を用いることができる。各種製剤形態への調製は、当業者が利用可能な周知の製剤添加物、例えば、希釈剤や添加剤などを用いて慣用の手法に従って行うことができる。

[0031] 例えば、注射用凍結乾燥粉末剤は、精製された前記プロテアーゼ阻害剤の有効量を注射用蒸留水、生理食塩水、ブドウ糖水溶液等の希釈液に溶解し、必要に応じてカルボキシメチルセファロース、アルギン酸ナトリウム等の賦形剤、ポリエチレングリコール、デキストラン硫酸ナトリウム、アミノ酸、ヒト血清アルブミン等の安定化剤、ベンジルアルコール、塩化ベンザルコニウム、フェノール等の保存剤、ブドウ糖、グルコン酸カルシウム、塩酸プロカイン等の無痛化剤、塩酸、酢酸、クエン酸、水酸化ナトリウム等のpH調節剤等を加え、常法により製造することができる。また、注射用アンプル剤は、前記プロテアーゼ阻害剤の有効量を注射用蒸留水、生理食塩水、リンゲル液などの希釈剤に溶解し、必要に応じてサリチル酸ナトリウム、マニトール等の溶解補助剤、クエン酸ナトリウム、グリセリン等の緩衝剤、ブドウ糖、添加糖等の等張化剤、前述の安定化剤、保存剤、無痛化剤、pH調節剤等の添加剤を加えた後、通常の加熱滅菌、無菌ろ過等により無菌化して調製することができる。なお、有効成分の種類によっては加熱滅菌工程で失活する場合があるので、滅菌方法は適宜選択すべきである。

[0032] 本発明の薬剤は、医薬上許容される担体等を用いて、錠剤、顆粒、カプセル剤、散剤等の固形状、あるいは液剤、懸濁剤、シロップ、乳剤、レモナーデ剤等の液状の態様で、経口投与、非経口投与に適した剤型に製剤化し、医薬製剤として用いることもできる。必要ならば、上記製剤に補助剤、安定化剤、湿潤剤、その他の常用添加剤、例えば乳糖、クエン酸、酒石酸、ステアリン酸、ステアリン酸マグネシウム、白土、蔗糖、トウモロコシ澱粉、タルク、ゼラチン、寒天、ペクチン、落花生油、オリーブ油、カカオ油、エチレングリコール等を配合してもよい。

(投与量)

[0033] 本発明の薬剤は、少なくとも1種のプロテアーゼ阻害剤を有効量含み、該プロテアーゼ阻害剤が癒着形成の部位において効果的な濃度で実質的に上皮化に足る十分な時間滞留するように投与することができる。

[0034] 本発明において、投与可能なプロテアーゼ阻害剤の量と濃度は、効果を得るに十分な濃度すなわち「有効量」を最低濃度とし、「薬学的に許容できる」「薬理的に許容できる」を最高濃度とした範囲で決定することができる。所望の癒着形成を防止、

抑制又は治療したい部位(腹部、胸部、眼、心臓、婦人科的組織等)で効果が得られるように、プロテアーゼ阻害剤混合物は適した剤型や媒体(生理食塩水)で、静脈内投与又は経口投与することができる。

[0035] 本発明において「有効量」という用語は、上記の癒着形成の防止、抑制又は治療において、微毒又は無毒で、所望する反応を得る為の薬剤の十分な量を意味する。求められる正確な量は被検体によってまちまちであり、被検体の種、年齢、体重、一般的体調、投与の形態などによって変わってくる。適切な「有効量」は、ここに提供された事と慣例的な方法を使用した普遍的な先行技術により決定することもできる。

[0036] 「薬学的に許容できる」とは、効果と危険性の比率的と比例して、過度の毒性、炎症、アレルギー反応又はその他の問題点又は合併症を伴わない、ヒト又は動物の組織との接触に適当な、信頼できる医療判断の範囲内の、物質、化合物、混合物又は投与形式を意味する。

[0037] 該プロテアーゼ阻害化合物は、一般的に作用する間隔で投与することができ、例えば手術前、手術中、手術完了後の期間にも投与することができる。術後少なくとも1〜72時間、好ましくは1〜48時間の間に投与を開始することができる。例えば静脈内投与の場合は、術後少なくとも1〜24時間、好ましくは1〜12時間の間に投与を開始することができ、経口投与の場合は、同様に1〜72時間、好ましくは12〜48時間、より好ましくは12〜24時間の間に投与を開始することができる。

[0038] 本発明の薬剤は、少なくとも1種のプロテアーゼ阻害剤が心保護を要する部位において効果的な濃度で実質的な投与量で投与することができる。例えば、本発明の薬剤に含有されるプロテアーゼ阻害剤の具体例であるキマーゼ阻害剤 (Suc-Val-Pro-L-Phe<sup>P</sup>(Oph)<sub>2</sub>) を手術中に10 μM使用したとき、該生体内のキマーゼ活性は血管組織において4週間にわたり顕著に抑制された。キマーゼ阻害剤 (Suc-Val-Pro-L-Phe<sup>P</sup>(Oph)<sub>2</sub>) の効果的な投与量は、成人体重1kg、1日あたり0.0001〜100mgの間で選択することができる。例えば静脈内投与の場合には0.001〜100mg、好ましくは0.01〜1mgの間で、また経口投与の場合には0.1〜100mg、好ましくは0.1〜10mgの間で投与量を選択することができる。

[0039] 他のプロテアーゼ阻害剤の効果的な量、経路は、公知の手段により決定することが

できる。

## 実施例 1

[0040] 以下に実施例を示して本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

[0041] (実施例1) アミノアルキルホスホン酸誘導体の調製

アミノアルキルホスホン酸のアリールジエステルのペプチド誘導体からなる薬剤は先行技術の1つによって証明され、実行される(Biochemistry, 30, p.485-493, 1991)。

[0042] キマーゼ活性と癒着形成との関係を説明するのに、典型的なセリンプロテアーゼ阻害剤、キマーゼ阻害剤、 $\text{Suc-Val-Pro-Phe}^{\text{P}}(\text{Oph})_2$  の効果を調べた。この化合物は公知の方法を使用し合成した(Biochemistry, 30, p.485-493, 1991)。さらに詳しくは、 $\text{Cbz-Val-OH}$  (0.25g, 1 mmol)、 $\text{DCC}$  (0.2g, 1 mmol) と水素和物  $\text{Cbz-Val-Pro-Phe}^{\text{P}}(\text{Oph})_2$  (0.584g, 1 mmol) は、30ml の酢酸エチルに溶解し、オイルを加える。この溶液に対し、0.1g (1 mmol) のコハク無水物と0.1g の5%  $\text{Pd/C}$  が加えられ、混合物は、薄層クロマトグラフィーが新しい斑点を示すまで、水素気圧下で攪拌される。触媒はろ過により取り除かれ、有機層は数回水で洗浄され、乾燥後有機溶媒は提供の為に除去させる。有機物として例えば、ハイドロスコープ固体としての0.45g (65%) の生成物が得られた ( $\text{mp. } 50-53^\circ\text{C.}$ ; one spot on TLC,  $R_f = 0.4$ ;  $^{31}\text{P}$  NMR 19.75, 19.23 ppm, ratio 1:1, Anal. Calcd. for  $\text{C}_{34}\text{H}_{40}\text{O}_3\text{N}_3\text{P}_2\text{H}_2\text{O}$ : 59.56; H, 6.42. Found: C, 59.59; H, 6.42)。

[0043] (実施例2)  $\text{Suc-Val-Pro-Phe}^{\text{P}}(\text{Oph})_2$  キマーゼ阻害剤の濃縮鏡像異性体の調製

以下に使用されているように、以下の略語が適用される。Z はベンジルオキシカルボニル、Boc は tert-ブチルオキシカルボニル、WSCD はカルボジイミド、HOBt は Oleksyszyn と Powers (Methods Enzymol, 244:423-441, 1994) 及びベンジルオキシカルボニルは水素臭化物酸溶液により取り除かれた。生成物をWSCD-HOBt 反応により Boc-Pro とカップリングさせ、その後ラセミ混合物を得た。その後、再沈殿により分離した。まず、溶液中の非活性鏡像異性体を結晶化させて、溶液から除去した。HCl を加えた Boc の溶液中の活性鏡像異性体からブロックを除いた後、試料をWSCD-HOBt 反応により Boc-Val とカップリングさせ、再度ブロックを除いて分離された。この生成物に対し、コハク無水物とトリエタノアミンを加え、 $\text{Suc-Val-Pro-Phe}^{\text{P}}$



(OPh)<sub>2</sub>を得た。そして、生成物を逆相HPLCによって濃縮した。

[0044] (Z-DL-Phe<sup>P</sup>(OPh)<sub>2</sub>)

フェニルアセトアルデヒド(28.3mL, 0.242mol)を45mLの酢酸で溶解した。カルバミル酸ベンジルエステル(24.4g, 0.161mol)とトリフェニル亜リン酸塩(50.0 g, 0.161 mol)をこの溶液に加え、1.5時間85°Cで攪拌した。有機溶剤を蒸発させた後、残りの溶液を室温まで冷まし、400mLのメタノールをこの溶液に加え、-20°Cで結晶化できるようにした。該生成物をろ過により集め、冷メタノールにより洗浄し、32.9g(42%)のZ-D-Phe<sup>P</sup>(OPh)<sub>2</sub>とZ-L-Phe<sup>P</sup>(OPh)<sub>2</sub>の化合物を産出するため真空内で乾燥した。

[0045] (DL-Phe<sup>P</sup>(OPh)<sub>2</sub>·HBr)

Z-Phe<sup>P</sup>(OPh)<sub>2</sub>とZ-L-Phe<sup>P</sup>(OPh)<sub>2</sub>(14.3g, 29.3 mmol)の混合物を30mLの25%水素臭化物／酢酸溶液中に溶解し、室温で1時間攪拌した。両方を加えた後、分離された固体試料をろ過によって集めた。この試料をエーテルで洗浄し、12g(94%)のDとL-Phe<sup>P</sup>(OPh)<sub>2</sub>·HBrの混合物を得る為に真空乾燥した。

[0046] (Boc-Pro-DL-Phe<sup>P</sup>(OPh)<sub>2</sub>)

DとL-Phe<sup>P</sup>(OPh)<sub>2</sub>·HBr(11.5g, 26 mmol), Boc-Pro(5.53g, 25.7mmol)とHOBt(3.58g, 26.5mmol)の混合物を70mLのDMFに溶解し、WSCD(4.70mL, 26.5mmol)を点滴によりで氷で冷却しながら加えた。室温で3.5時間攪拌した後、溶液を真空で濃縮し、エチルアセテートを加えた。結果により得られた溶液を逐次、酢酸とアルカリ性溶液で洗浄し、MgSO<sub>4</sub>で乾燥し、真空乾燥濃縮した。アセトン-エーテルにより結晶化させ、同様に再結晶化させて不活性鏡像異性体(D体)を除去し、Boc-Pro-L-Phe<sup>P</sup>(OPh)<sub>2</sub>を得た。残存溶液を真空で濃縮し、5.10gの鏡像異性体を産出するための溶解剤としてトルエン-エチルアセテート(5:1)を加え、中圧シリカゲルで精製した。

[0047] (Boc-Pro-L-Phe<sup>P</sup>(OPh)<sub>2</sub>)

Boc-Pro-L-Phe<sup>P</sup>(OPh)<sub>2</sub>(4.98g, 9.05 mmol)を37mLの冷HCl／ジオキサン(4.9N)に溶解し、室温で1時間攪拌した。概溶液は真空で蒸発、乾燥させた。残物を40mLのDMFで溶解し、Boc-Val(2.06g, 9.50 mmol)とHOBt(1.35g, 9.96 mmol)をこの溶液に加えた。WSCD(1.77mL, 9.96 mmol)を点滴又は氷で冷やしながらこの溶液に加え、室温で一晩攪拌した。酢酸エチルをこの反応溶液に加え、引き続いて、酸性とアル

カリ性の溶液で洗浄した。MgSO<sub>4</sub>で乾燥させ、ろ過した後、無色オイルとして6.26g(94%)の生成物を産出し、真空中で濃縮した。

[0048] (Suc-Pro-L-Phe<sup>P</sup>(OPh)<sub>2</sub>)

Boc-Pro-L-Phe<sup>P</sup>(OPh)<sub>2</sub> (5.86g, 8.47 mmol)を35mLの冷HCl/ジオキサン(4.9 N)に加え溶解し、室温で1時間攪拌した。概溶液を真空中で蒸発、乾燥した。残物を35mLのDMFを加え溶解し、コハク無水物(1.02g, 10.2mmol)を加えた。トリエチルアミン(2.36mL, 16.9mmol)を点滴によりこの溶液に加え、室温で2時間攪拌した。氷冷しながらHCl溶液により溶液のpHがpH1.0 となるように調整し、酢酸エチルを加えて試料を抽出した。抽出物を飽和塩水溶液で洗浄し、MgSO<sub>4</sub>で乾燥させ、黄色オイルとして生成物を産出し、真空中でろ過、濃縮した。オイルを逆相HPLC(分離管:YMC ODS SH-363-5, 30×250mm, 移動相:0.1TFA, 勾配40-70% MeCN)により濃縮し、ホワイトパウダーとして、2.30g(42%)の生成物を産出し冷却乾燥した。

[0049] (分析結果)

試料:Suc-Val-Pro-L-Phe<sup>P</sup>(OPh)<sub>2</sub>

Lot.:520217

Volume:2.0g×1

概観:白粉

HPLCによる純度:主ピーク 98.8%

HPLCコンディション:

カラム:YMC Pack, ODS-A 4.6mm I.D.×150mm

移動相:0.1%TFA, 勾配 30-80% MeCN (25min)

流率 :1.0mL/min

検出 :フォトメーターにより紫外線吸光度(波長:220nm)

アミノ酸分析:                      モル率              回収率

Val(I)              1.00              90.5%

Pro(I)              1.03

Phe<sup>P</sup>(Oh)<sub>2</sub>              0.98

加水分解状況:6mol HCl, phenol, 110°C, 22時間

基本分析 : Calcd  $C_{34}H_{40}N_3O_8S$ : C, 62.86; H, 6.21; N, 6.47%

Calcd  $C_{34}H_{40}N_3O_8S \cdot 8H_2O \cdot 0.5TFA$ :

C, 58.30; H, 5.88; N, 5.83%

Hound: C, 58.34; H, 5.94; N, 5.51%

マスペクトロメトリー: 650.3 (Calcd  $[M+H]^+$  <sub>exact</sub>) = 650.253 (by

ESI-MS))

[0050] (実験例) Suc-Val-Pro-L-Phe<sup>P</sup>(OPh)<sub>2</sub> の内服による心筋梗塞後の生存率

シリアンハムスター(SLC社)、年齢6週間(体重85〜90グラム)をの左冠動脈を結紮し、心筋梗塞モデルを作製した(Jpn. J. Pharmacol, 86, p.203-214, 2001, Life Sci. 71, p.437-446, 2002)。キマーゼ阻害薬であるSuc-Val-Pro-L-Phe<sup>P</sup>(OPh)<sub>2</sub> (10mg/kg)(9例)又は偽薬(23例)をモデル作製前3日よりモデル作成後14日まで1日1回、ゾンデで強制経口投与し、モデル作製後14日までの癒着程度を比較検討した。尚、生存曲線よりログランク検定を用いて有意差検定を行った。

その結果、14日までの偽薬群の生存率は39.1%であったのに対し、Suc-Val-Pro-L-Phe<sup>P</sup>(OPh)<sub>2</sub> (10mg/kg)を術前より投与した群では88.9%であり、有意にSuc-Val-Pro-L-Phe<sup>P</sup>(OPh)<sub>2</sub> 投与群で生存率が増加した(図1)。

また、同様に14日までの偽薬群の生存率は39.1%であったのに対し、Suc-Val-Pro-L-Phe<sup>P</sup>(OPh)<sub>2</sub> (10mg/kg)を術後経口投与した群では88.9%であり、有意にSuc-Val-Pro-L-Phe<sup>P</sup>(OPh)<sub>2</sub> 投与群で生存率が増加した(図2)。

Suc-Val-Pro-L-Phe<sup>P</sup>(OPh)<sub>2</sub> は、心筋梗塞を起こす前より投与することにより、有意にその生存率を改善することができ、また心筋梗塞後に投与しても有意に改善することができた。このことより、Suc-Val-Pro-L-Phe<sup>P</sup>(OPh)<sub>2</sub> は、心筋梗塞の予防及び梗塞後の生存率を向上させるのに有用である。

#### 産業上の利用可能性

[0051] 以上説明したように、本発明の心保護剤を内服することで、心筋梗塞の予防が可能となり、また、心筋梗塞が生じた後の生存率も改善したことから、心筋梗塞等に伴う不整脈、心臓繊維化、心不全に対する心保護剤として有用であることが示唆された。

#### 図面の簡単な説明

[0052] [図1]心筋梗塞前より偽薬またはSuc-Val-Pro-L-Phe<sup>P</sup>(OPh)<sub>2</sub>を内服させたときの生存率を示す図である。(実験例)

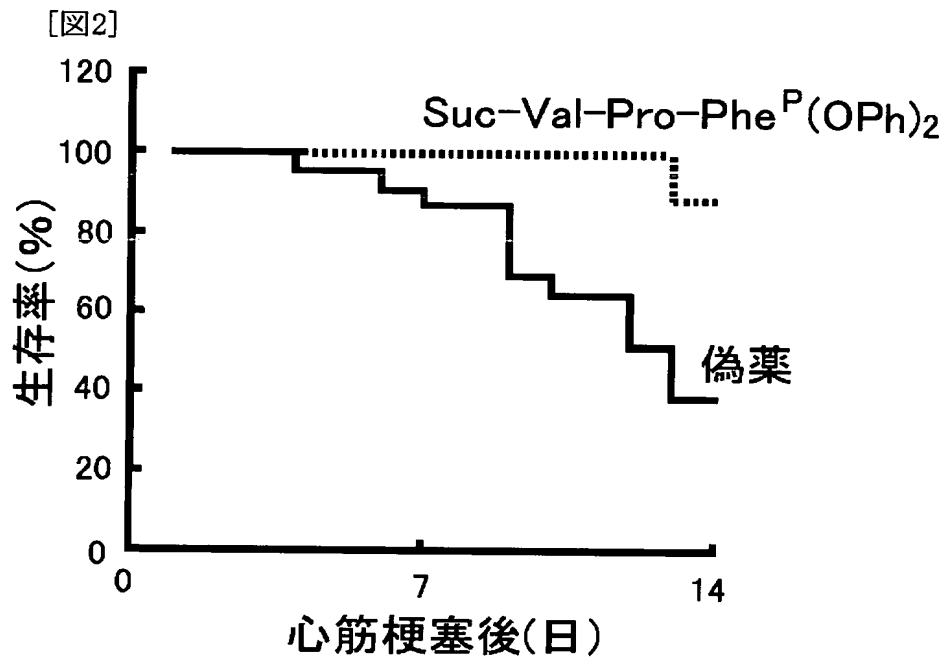
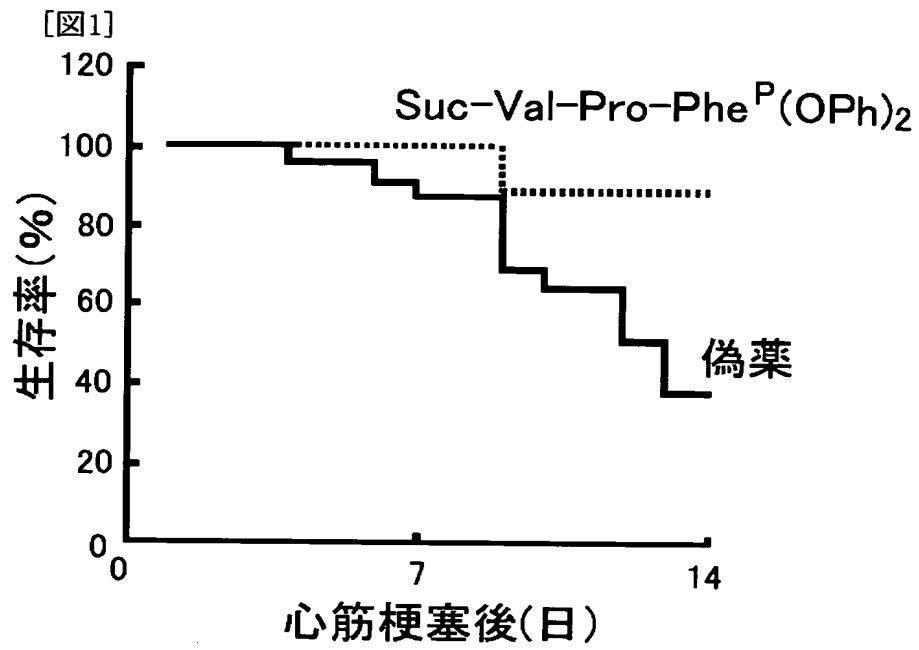
[図2]心筋梗塞後に偽薬またはSuc-Val-Pro-L-Phe<sup>P</sup>(OPh)<sub>2</sub>を内服させたときの生存率を示す図である。(実験例)

## 請求の範囲

- [1] 少なくとも1のプロテアーゼ阻害剤を有効量含む薬剤であって、静脈内投与又は経口投与されることを特徴とする心保護剤。
- [2] 該プロテアーゼ阻害剤が、セリンプロテアーゼの阻害剤である、請求項1に記載の心保護剤。
- [3] 該セリンプロテアーゼの阻害剤が、キモトリプシン様セリンプロテアーゼの阻害剤である請求項2に記載の心保護剤。
- [4] 該キモトリプシン様セリンプロテアーゼの阻害剤が、キマーゼの阻害剤である請求項3に記載の心保護剤。
- [5] 該キマーゼの阻害剤が、 $\alpha$ -アミノアルキルホスホン酸のアリールジエステルのペプチド誘導体である請求項4に記載の心保護剤。
- [6] 該キマーゼの阻害剤が、 $\text{Suc-Val-Pro-Phe}^{\text{P}}(\text{OPh})_2$ である請求項4の心保護剤。
- [7] 該キマーゼ阻害剤が、 $\text{Suc-Val-Pro-Phe}^{\text{P}}(\text{OPh})_2$ の鏡像異性体 $\text{Suc-Val-Pro-L-Phe}^{\text{P}}(\text{OPh})_2$ の濃縮製剤である請求項4に記載の心保護剤。
- [8] 該鏡像異性体濃縮製剤において、 $\text{Suc-Val-Pro-L-Phe}^{\text{P}}(\text{OPh})_2$ が $\text{Suc-Val-Pro-Phe}^{\text{P}}(\text{OPh})_2$ の総重量の95%以上を含有する請求項7に記載の心保護剤。
- [9] 該プロテアーゼ阻害剤が、当該部位において当該プロテアーゼ阻害剤の効果的な局所濃度を維持する伝達体と結合して投与され、そして、当該伝達体は、ヒアルロン酸、ヒドロゲル、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、シクロデキストラン、そしてその化合物からなる集合体より選択された高分子量担体をなす、請求項1〜8のいずれか1に記載の心保護剤。
- [10] 請求項1〜9のいずれか1に記載のプロテアーゼ阻害剤と、薬学的に許容できる希釈液又は賦形剤からなる心保護剤混合物。
- [11] 脊椎動物被検体に対し、高血圧、心肥大、心筋梗塞、動脈硬化、糖尿病性及び非糖尿病性腎疾患、PTCA施行後の再狭窄等に伴う不整脈、心臓繊維化、心不全が危惧される場合における請求項10に記載の心保護剤混合物を投与する不整脈、心臓繊維化及び／又は心不全の改善方法。
- [12] 請求項10に記載の心保護剤混合物の使用に関し、高血圧、心肥大、心筋梗塞、動

脈硬化、糖尿病性及び非糖尿病性腎疾患、PTCA施行後の再狭窄等に伴う不整脈、心臓繊維化、心不全が危惧される場合の不整脈、心臓繊維化及び／又は心不全に応用するための薬品を作るための使用。

- [13] 高血圧、心肥大、心筋梗塞、動脈硬化、糖尿病性及び非糖尿病性腎疾患、PTCA施行後の再狭窄等に伴う不整脈、心臓繊維化、心不全が危惧される場合の請求項10に記載の心保護剤混合物の不整脈、心臓繊維化及び／又は心不全改善剤としての使用。



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/006384

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> A61K45/00, A61P9/04, 9/06

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> A61K45/06, A61P9/04, 9/06

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
CA (STN), MEDLINE (STN), EMBASE (STN), BIOSIS (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	Fumihiro HOSHINO et al., Chymase Inhibitor Improves Survival in Hamsters with Myocardial Infarction, Journal of Cardiovascular Pharmacology, 2003 January, Vol.41, Suppl.1, S11-18	1-4, 9-10 5-8
X Y	Yoshikazu SUKENAGA et al., Development of the Chymase Inhibitor as an Anti-Tissue-Remodeling Drug: Myocardial Infarction and Some Other Possibilities, Jpn.J.Pharmacol., 2002, Vol.90, pages 218 to 222	1-4, 9-10 5-8
X Y	Denan Jin et al., Beneficial effects of cardiac chymase inhibition during the acute phase of myocardial infarction, Life Sciences, 2002, Vol.71, pages 437 to 446	1-4, 9-10 5-8

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
05 August, 2004 (05.08.04)

Date of mailing of the international search report  
31 August, 2004 (31.08.04)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/006384

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	Denan Jin et al., Impact of chymase inhibitor on cardiac function and survival after myocardial infarction, Cardiovascular Research, 2003, Vol.60, pages 413 to 420	1-4, 9-10
Y	Shinji TAKAI et al., Inhibition of chymase reduces vascular proliferation in dog grafted veins, FEBS Letters, 2000, Vol.467, pages 141 to 144	5-8

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2004/006384

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 11-12

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claims 11-12 pertain to methods for treatment of a human body by therapy and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required to search under the provisions of PCT Article 17(2)(a)(i) and Rule 39.1(iv).

2. ☐ Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/006384

Claims 1-4 and 9-10 relate to a cardioprotective agent comprising a compound defined by the desired property "protease inhibitor" as an active ingredient. Claims 1-4 and 9-10 comprehend all compounds with this property. However, only some of the claimed compounds are supported by the description within the meaning of PCT Article 6 and disclosed therein within the meaning of PCT Article 5.

Further, with respect to the "protease inhibitor", the scope of compounds with this property cannot be specified even if technical common knowledge at the filing of this application is taken into account. Therefore, claim 1 also fails to satisfy the requirement of clarity prescribed in PCT Article 6.

Therefore, search has been conducted only on the relationship between protease inhibitor and cardioprotective agent and on the cardioprotective agents comprising compounds concretely described in the description and specified in claims 5-8 as an active ingredient. With respect to claims 5-8, complete search has been conducted.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> A61K45/00, A61P 9/04, 9/06

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> A61K45/06, A61P 9/04, 9/06

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

## 国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA (STN), MEDLINE (STN), EMBASE (STN), BIOSIS (STN)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	Fumihiro Hoshino et al., Chymase Inhibitor Improves Survival in Hamsters with Myocardial Infarction, Journal of Cardiovascular Pharmacology, 2003 Jan., Vol. 41, Suppl 1, S11-18	1-4, 9-10 5-8
X Y	Yoshikazu Sukenaga et al., Development of the Chymase Inhibitor as an Anti-Tissue-Remodeling Drug: Myocardial Infarction and Some Other Possibilities, Jpn. J. Pharmacol., 2002, Vol. 90, p. 218-222	1-4, 9-10 5-8

☒ C欄の続きにも文献が列举されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

05.08.2004

国際調査報告の発送日

31.8.2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

八原 由美子

4C

9261

電話番号 03-3581-1101 内線 3451

C (続き) 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	Denan Jin et al., Beneficial effects of cardiac chymase inhibition during the acute phase of myocardial infarction, Life Sciences, 2002, Vol. 71, p. 437-446	1-4, 9-10 5-8
P X	Denan Jin et al., Impact of chymase inhibitor on cardiac function and survival after myocardial infarction, Cardiovascular Research, 2003, Vol. 60, p. 413-420	1-4, 9-10
Y	Shinji Takai et al., Inhibition of chymase reduces vascular proliferation in dog grafted veins, FEBS Letters, 2000, Vol. 467, p. 141-144	5-8

## 第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項(PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 11-12 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。  
つまり、  
請求の範囲11-12は治療による人体の処置方法に関するものであって、PCT17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(iv)の規定により、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
2. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。  
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

請求の範囲1-4, 9-10は、「プロテアーゼ阻害剤」という所望の性質により定義された化合物を有効成分とする心保護剤に関するものである。そして、請求の範囲1-4, 9-10は、そのような性質を有するあらゆる化合物を包含するものであるが、PCT 6条の意味において明細書に裏付けられ、また、PCT 5条の意味において開示されているのは、クレームされた化合物のごくわずかな部分にすぎないものと認められる。

また、「プロテアーゼ阻害剤」は、出願時の技術常識を勘案してもそのような性質を有する化合物の範囲を特定できないから、請求の範囲1は、PCT 6条における明確性の要件も欠いている。

よって、調査は、プロテアーゼ阻害剤と心保護剤との関係について、及び、明細書に具体的に記載され、請求の範囲5-8に特定されている化合物を有効成分とする心保護剤について行った。また、請求の範囲5-8については、完全な調査を行った。